植 物 分 类 与 资 源 学 报 2015，37（5）：595～604
Plant Diversity and Resources DOI：10.7677/ynzwyj201515004

基于EST-SSR标记的莲属种质资源遗传多样性分析*

徐玉仙[1,2,3]，张微微[2,4]，莫海波[2]，李 春[2,3]，曹建国[1]，田代科[2,3**]

（1 上海师范大学生命与环境科学学院，上海 200234；2 上海辰山植物园、中国科学院上海辰山植物科学研究中心，上海 201602；3 上海市资源植物功能基因组学重点实验室，上海 201602；4 上海农林职业技术学院，上海 201600）

摘要：利用EST-SSR分子标记对30个亚洲莲、6个美洲莲及14个亚美杂交莲品种（野生居群）进行遗传多样性分析，结果表明：从123对EST-SSR引物中筛选出52对（42.3%）扩增稳定、具有多态性的引物；利用这52对引物对50个不同类型代表的莲属品种进行扩增，共获得177条多态性条带，引物的等位基因数和多态性信息量（PIC）的范围分别为2～8个和0.63（NNFB-1059）- 0.91（NNFB-750），平均为3.4个和0.79。利用NTSYS-pc2.11软件对扩增结果进行Jaccard相似性系数分析，50个荷花品种材料遗传相似系数为0.24～0.86；通过UPGMA法进行聚类分析，在遗传相似系数0.37处供试荷花材料可分为4大类群：亚洲莲品种均聚类在I、II类群中，III类群绝大部分为亚美杂交莲品种，IV类群为美洲莲，亚美杂交莲品种与亚洲莲品种的亲缘关系相对较近，与传统分类及前人研究结果相一致。

关键词：莲；EST-SSR；遗传多样性；亲缘关系

中图分类号：Q 16 **文献标志码**：A **文章编号**：2095-0845(2015)05-595-10

Genetic Diversity Analysis of *Nelumbo* Accessions Based on EST-SSR Markers

Xu Yu-xian[1,2,3], Zhang Wei-wei[2,4], Mo Hai-bo[2], Li Chun[2,3], Cao Jian-guo[1], Tian Dai-ke[2,3**]

(1 *College of Life and Environmental Sciences*, *Shanghai Normal University*, Shanghai 200234, China; 2 *Shanghai Chenshan Plant Science Research Center*, *Chinese Academy of Sciences*, *Chenshan Botanical Garden*, Shanghai 201602, China; 3 *Shanghai Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Resources*, Shanghai 201602, China; 4 *Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry*, Shanghai 201600, China)

Abstract: EST-SSR markers were applied to estimate the genetic diversity for 30 accessions of *Nelumbo nucifera*, 6 accessions of *Nelumbo lutea* and 14 hybrids between these two species. The 52 of 123 EST-SSR markers (42.3%) were screened and then applied to amplify the 50 *Nelumbo* accessions. A total of 177 alleles were identified, and the number of alleles per locus and Polymorphic Information Content (PIC) value varied from 2 to 8 with an average of 3.4 alleles and from 0.63 (NNFB-1059) to 0.91 (NNFB-750) with an average value of 0.79, respectively. Jaccard similarity coefficients of the amplification results were analyzed by NTSYS-pc2.11 software and the genetic similarity coefficient was from 0.24 to 0.86. The clustering dendrogram constructed by UPGMA method indicated that 50 accessions of *Nelumbo* could be divided into four major groups at the similarity coefficient of 0.37. Group I and group II included *N. nucifera*; group III included the majority of Asian-American lotus hybrids; and group IV included *N. lutea*. In addition, the Asian-American hybrids were closer to *N. nucifera* based on genetic relationship, which is consistent with the traditional classification result and the previous reports.

Key words: *Nelumbo*; EST-SSR; Genetic diversity; Genetic relationship

---

* 基金项目：上海市绿化和市容管理局攻关项目（F112421）、上海市绿化和市容管理局科学技术项目（G142427）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：dktian@sibs.ac.cn
收稿日期：2015-01-06，2015-03-16接受发表
作者简介：徐玉仙（1987-）女，硕士，主要从事园艺植物分子生物学方面的研究。

莲，又名荷花，莲科（Nelumbonaceae）莲属（*Nelumbo*）多年生水生草本植物，不仅是中国的传统名花，印度和越南的国花，也是世界著名的观赏、食用和药用植物，因此具有十分重要的经济和文化价值（王其超和张行言，2005）。莲属植物仅两种：分布于亚洲、澳洲北部的亚洲莲（*Nelumbo nucifera* Gaertn.）和分布于北美、中美洲、南美的美洲莲（*Nelumbo lutea* Willd.）（John 等，2014），两者虽然在地理上存在隔离，但相互杂交可孕，不存在生殖隔离现象（黄秀强等，1992）。

荷花在中国栽培历史悠久，产生了极其丰富的品种，目前全世界通过自然变异直接筛选、人工杂交、离子注入和太空辐射等手段培育出的品种接近2 000个。莲属，特别是亚洲莲的遗传多样性极为丰富，但其种下分类及亲缘关系还不十分明确，甚至还存在一些混淆；一些野生资源已处于濒危处境，亟待加强保护（董玉琛和郑殿升，2005；Tian 等，2008）。此外，传统的以花色、花型、株型等形态学特征为标准的分类法很难将所有资源准确分类和鉴定。因此，在形态学特征观察的基础上以分子标记技术为补充可更好地研究荷花种质资源的遗传多样性和亲缘关系，这将对莲属资源的分类、鉴定、育种和保护具有重要意义。

近年来，随着分子生物技术的迅速发展，利用RAPD、SRAP、AFLP、ISSR，基因组SSR等分子标记进行荷花种质资源遗传多样性及亲缘关系的研究报道较多（彭欲率等，2004；汪岚等，2004；刘月光等，2006；Xue 等，2006；Guo 等，2007；Han 等，2007；Chen 等，2008；Han 等，2009；Kubo 等，2009a；Na 等，2009；Li 等，2010；Fu 等，2011；Pan 等，2011；吴景栋等，2011；Hu 等，2012；Liu 等，2012；欧阳冬梅等，2012；Yang 等，2012a；刘艺平等，2013；Yang 等，2013）。SSR（简单序列重复）标记又称微卫星DNA，是近年来发展起来的建立在PCR基础上的第二代分子标记，是指真核生物基因组中散在分布的由1~6个碱基对组成的简单重复序列，根据引物开发序列来源不同，可分为基因组SSR标记（来源于基因组序列，gSSR）和转录组SSR标记（来源于转录组序列或EST序列，EST-SSR）。EST-SSR作为一种与基因表达相关的SSR分子标记，不仅具备传统基因组SSR标记的共显性、多态性高、重复性好等特点，而且随着高通量测序技术的发展，其开发经济、通用性高及性状连锁等优势已在很多植物研究中得到开发和应用（姚利华和滕元文，2008；杨春和刘爱忠，2011）。但是，至今利用EST-SSR标记进行荷花种质资源的遗传多样性方面的研究非常有限，且标记数和分析的品种数量均很少（Kubo 等，2009b；Pan 等，2010；Yang 等，2013）。

本实验利用52对EST-SSR引物对50个不同类型代表性的荷花品种进行遗传多样性分析，旨在了解其遗传背景及亲缘关系，为今后荷花种质资源分类、保护利用、品种鉴定及分子标记辅助育种（MAS）等奠定理论基础和提供实践参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取50个来自不同地区、不同类型的代表性荷花品种为材料，包括30个亚洲莲、6个美洲莲及14个亚美杂交莲（表1）。所有材料均通过无性繁殖种植于上海辰山植物园“国际荷花资源圃”，经作者之一田代科博士鉴定，所有材料均有腊叶标本或照相记录作为凭证。

1.2 基因组DNA的提取

取鲜样（幼嫩叶）100 mg，用液氮磨成粉状，再用DNA试剂盒（DP320，北京天根）提取基因组DNA。DNA提取后于0.8%琼脂糖凝胶电泳进行检测，电泳缓冲液为1×TAE，电压100 V；DNA纯度和浓度测量利用NanoDrop 2000紫外可见光谱仪（Thermo）进行测定，稀释至50 ng·μL^{-1}的工作液。

1.3 SSR分析

PCR扩增反应总体积为10 μL，其中反应混合液中包括：5 μL的2×ES Taq mix（北京康为），DNA（50 ng·μL^{-1}）模板1 μL，引物0.5 μL（10 μM），3.5 μL的ddH_2O。PCR扩增反应程序：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，52 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共30个循环；最后72 ℃延伸5 min。PCR产物中加入6 μL变性剂94 ℃变性5 min，迅速放于冰上冷却，6%聚丙烯酰胺凝胶进行检测，银染方法显色。白炽灯下观察电泳结果，进行数据统计和扫描照相。实验所有EST-SSR引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.4 数据分析

EST-SSR扩增产物以0、1统计建立数据库。在相同迁移率位置上，有带记为1，无带记为0，缺失数据记为–。

表 1　50 个荷花品种材料信息

Table 1　Characteristics of 50 *Nelumbo* accessions

编号 No.	品种名（缩写） Accession name（ab.）	种源 Species	品种类型 Type	生态型 Habitat	株型 Plant size	花型 Flower form	花色 Flower color
1	黄莲-1#（NL-1#）	美洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	黄色
2	黄莲-3#（NL-3#）	美洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	黄色
3	黄莲-4#（NL-4#）	美洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	黄色
4	黄莲-8#（NL-8#）	美洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	黄色
5	黄鸟（YB）	美洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	黄色
6	艾江南（AJN）	美洲莲	栽培型	温带型	中小株	半重瓣	黄色
7	粉团（FT）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	重瓣	粉色
8	粉青莲（FQL）	亚洲莲	栽培型	温带型	中小株	单瓣	复色
9	湘韵（XY）	亚洲莲	栽培型	热带型	中小株	单瓣	复色
10	粉凌云（FLY）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	重瓣	粉色
11	冬红花（DHH）	亚洲莲	栽培型	热带型	大株	单瓣	红色
12	傲霜（AoS）	亚洲莲	栽培型	热带型	大株	单瓣	白色
13	雪里红花（XLHH）	亚洲莲	栽培型	热带型	中小株	单瓣	红色
14	普兰店古莲（PLDGL）	亚洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	红色
15	千瓣莲（QBL）	亚洲莲	野生型	温带型	大株	千瓣	粉色
16	北孙各庄古莲（BSGZGL）	亚洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	红色
17	鄂莲 3 号（EL-3）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	白色
18	玉臂藕（YBL）	亚洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	复色
19	白洋淀白莲（BYDBL）	亚洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	白色
20	青菱红莲（QLHL）	亚洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	红色
21	白洋淀红莲（BYDHL）	亚洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	红色
22	黑龙江红莲（HLJHL）	亚洲莲	野生型	温带型	大株	单瓣	红色
23	八一莲（BYL）	亚洲莲	栽培型	温带型	中小株	单瓣	粉色
24	总统（TP）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	红色
25	小红十八（XHSB）	亚洲莲	栽培型	热带型	中小株	单瓣	红色
26	粉红凌霄（Thai-2#）	亚洲莲	野生型	热带型	大株	重瓣	红色
27	泰国莲-8#（Thai-8#）	亚洲莲	野生型	热带型	大株	单瓣	白色
28	泰国莲-10#（Thai-10#）	亚洲莲	野生型	热带型	大株	单瓣	白色
29	易建莲（YJL）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	红色
30	巨子（JZ）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	红色
31	一丈青（YZQ）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	白色
32	单洒锦（DSJ）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	复色
33	大洒锦（DaSJ）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	重瓣	复色
34	艳阳天（YYT）	亚洲莲	栽培型	温带型	中小株	单瓣	红色
35	至尊千瓣（ZZQB）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	千瓣	红色
36	中山红莲（ZSHT）	亚洲莲	栽培型	温带型	大株	重台	红色
37	杏黄（XH）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	中小株	单瓣	黄色
38	黄羚羊（HLY）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	中小株	重台	黄色
39	卡罗琳娜皇后（CQ）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	复色
40	伯里夫人（SLCM）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	大株	重瓣	复色
41	舞妃莲（WFL）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	复色
42	友谊牡丹莲（YYMDL）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	大株	重瓣	黄色
43	旭日耀芒（GS）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	大株	半重瓣	黄色
44	春晓（CX）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	中小株	半重瓣	复色
45	粉舞妃（FWF）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	中小株	单瓣	复色
46	黄舞妃（HuWF）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	大株	单瓣	黄色
47	美三色（MSS）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	中小株	单瓣	复色
48	茉莉莲（MLL）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	中小株	单瓣	黄色
49	小舞妃（XWF）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	中小株	单瓣	复色
50	黄牡丹（HMD）	亚美杂交莲	栽培型	温带型	中小株	重瓣	黄色

注：编号为 1-4，26-28 七个荷花材料为野生居群

数据分析采用 NTSYS-pc2.11 软件进行，以 Jaccard 计算遗传相似系数，利用非加权组平均法（UPGMA）对 50 个供试荷花品种进行聚类分析，构建分子系统树。多态性信息（PIC）值计算方法参照 Botstein 等（1980）。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR 引物筛选

从本课题组基于荷花转录组序列信息开发并经过有效性检测的 123 对 EST-SSR 引物中筛选出 52 对扩增稳定、具有多态性的引物（图 1），多态性比率为 42.3%。随后利用具多态性的 EST-SSR 引物对 50 个荷花品种进行扩增，共扩增出 177 条多态性条带，每对引物的等位基因数范围从 2 到 8 个，平均为 3.4 个（表 2），这一结果与 Hu 等（2012）研究结果相似。多态性信息量（PIC）是用来评估引物多态性信息量水平（高：PIC > 0.5；适中：0.5 > PIC > 0.25；低：PIC < 0.25）（Botstein 等，1980）。在本实验所筛选的 52 对 EST-SSR 引物中，所得 PIC 值的范围从 0.63（NNFB-1059）到 0.91（NNFB-750），平均为 0.79，这表明本实验所筛选的引物具有较高的多态性，可以有效地用于荷花遗传多样性分析。

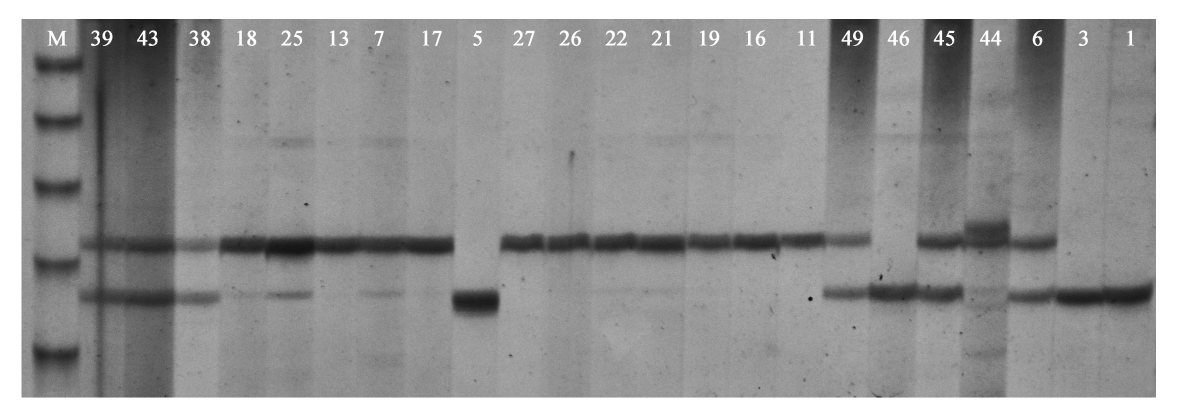


图 1 引物 NNFB-2779 对部分荷花品种扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图（编号同表 1）

Fig. 1 Amplification profiles of primer pair NNFB-2779 separated in PAGE (No. is same as Table 1)

表 2 52 对 EST-SSR 标记引物特征

Table 2 Characteristics of 52 EST-SSR primers

编号 No.	引物名称 Primer name	SSR 基序 SSR motif	引物序列 F/R (5′-3′) Primer sequence (5′-3′)	等位基因 Allele	多态性信息量 PIC
1	NNFB_28	(TC)8	F：GAAACGAACTTCAGCCAAGC R：AGCCGTGGTTTGTACGAGTT	3	0.79
2	NNFB_34	(AG)7	F：CGGGCAATAAATCCATCACT R：TTTCCCTACTGATGCCTGGT	2	0.74
3	NNFB_79	(TC)8	F：GAGAGGAGGGGTGGAGAATC R：GGGATGGGAGAAATGGAGAT	2	0.65
4	NNFB_83	(TCT)10	F：CAGCACCATTCTGTAATCGC R：GTGTGAGCGTATTTGGATCG	6	0.88
5	NNFB_86	(TC)6	F：TTGGTGGATTGGAATGTAAGG R：TCACCTCCACAGCACAGAAC	4	0.80
6	NNFB_125	(TC)15	F：AGAAGAACAGTGGAAGCCGA R：GGGAATTGAGGATTCGATGA	3	0.78
7	NNFB_184	(CT)8	F：AGAATGGTTGATGGGTAGCG R：CCATGACAACTTCATCTTCGAG	3	0.79
8	NNFB_186	(TC)14	F：TCTCTGTCCACAAACCGATG R：CAGATTCTGGGTTTCCTCCA	3	0.82
9	NNFB_404	(TC)9	F：AATTGCAAGGGAAGGTTGAA R：GCAGCTTTAAGGCCAAACTG	3	0.82

续表 2 Table 2 continued

编号 No.	引物名称 Primer name	SSR 基序 SSR motif	引物序列 F/R(5′-3′) Primer sequence (5′-3′)	等位基因 Allele	多态性信息量 PIC
10	NNFB_455	(AG)12	F：AGCCAGGAGGAGATAGAGGG R：ATAAGGGTGAAATGGGAGGG	5	0.87
11	NNFB_457	(AG)13	F：ACAACCAACCCTCTTGCATC R：GAGAGCTTGTCAAAGGGTGC	3	0.80
12	NNFB_510	(GA)8	F：CCAGAGCCGTAAGCGTAGTC R：GCCCCGAACTCAATTACTCA	2	0.73
13	NNFB_572	(AG)13	F：CAACAGCGCAAAAGAAACAA R：TCGTCTTTGCAGAACCACTG	2	0.74
14	NNFB_596	(CGC)9	F：GCGGCAAACTCCAAACAAG R：TGGGAACGACATGAGCATTA	2	0.73
15	NNFB_625	(TC)7	F：TGTGATGAATGGTGGTGCTT R：AGAACGCCTTCAATTGGATT	4	0.84
16	NNFB_652	(GAT)8	F：GTGGAAGCACCGTTTCATCT R：TGAAGCAACAGGATGGACAA	3	0.82
17	NNFB_671	(TC)9	F：GCATCGCTGCAAACTGAATA R：GTGGAGCCTCCGACTATTTG	5	0.87
18	NNFB_730	(TCT)5	F：TGATTTCTCCCAGACCCATC R：TGTCGAAGAAAGGGAATTGG	2	0.74
19	NNFB_750	(CT)10	F：ACTTTGAGCTTGATCGGCAC R：CAGCTGAACGGAACTGAGAA	8	0.91
20	NNFB_764	(TCC)7	F：CATTCCATCTTATGTATCCATTTCA R：GGTCGAGGAACCATGAGAAA	2	0.67
21	NNFB_797	(TA)7	F：CTTCCGTTTTCCTTTCCCTC R：GCCTGCTCTGACAGTAACCC	3	0.81
22	NNFB_829	(CTG)6	F：CCATCCAACCAAAATTCACC R：AGCAGGTCGAGAGAGAGTGG	3	0.82
23	NNFB_837	(GAA)5	F：TGACCAGAAAAGAAGCCCAG R：GATTGCCTTAGCCAGCAGTC	6	0.87
24	NNFB_871	(TC)13	F：CAGGTCCAGAGGCTGTTAGC R：GGTCCTCATCTTCTTGCAGC	2	0.75
25	NNFB_1059	(CT)7	F：GGAAAATGGAAGCGGAATTT R：CTTCTTGCCCTTCTCCTCCT	2	0.63
26	NNFB_1140	(CT)7	F：CCTGGGGTTTAAGTTGTGGA R：TTGGGATTTAGACCCAGCAG	5	0.87
27	NNFB_1167	(AGA)6	F：GGATGCGTGGAGATCAGAAT R：ATAAATTGATCTGGCCGACG	3	0.78
28	NNFB_1211	(AG)8	F：TGGTCTCGACAGCATTGAAG R：GGTCAATCATCCCACTTGCT	2	0.74
29	NNFB_1375	(CT)8	F：TACCGTGCCTTCATCCTCTC R：ATGAAGAGCCCTGTCACCAG	4	0.85
30	NNFB_1390	(GGA)5	F：ACATGTTGCAAGTGAGCCTG R：CCAGCAGCTGTAGTCCCTTC	2	0.68
31	NNFB_1504	(GAA)6	F：CGGGAGGATTGAATCAGAAA R：CTTTCTCTGCGTCTGGCTTC	3	0.82
32	NNFB_1556	(GA)6	F：GTAGCACGATGACCTGCTGA R：TCGTTGACAAAAGGCTTTGC	2	0.67
33	NNFB_1601	(GA)6	F：AGGAAGAAGCAGTGCCAAAA R：TTGTTTGGTTGTTCCCTCGT	3	0.82

续表 2 Table 2 continued

编号 No.	引物名称 Primer name	SSR 基序 SSR motif	引物序列 F/R(5′-3′) Primer sequence (5′-3′)	等位基因 Allele	多态性信息量 PIC
34	NNFB_1635	(GAA)5	F: ACCACGTAACTCGAACCAGG R: CAGAGCAGAGGCACACGTTA	2	0.62
35	NNFB_1695	(AG)7	F: ATGGTGAGGGGAAAGGAATC R: AGCAGCAGGCATTCTGATTT	2	0.65
36	NNFB_1814	(CT)8	F: TGAACTGATGTTCATGGGGA R: GCAACCCTGCAACTACTGCT	4	0.84
37	NNFB_1817	(AG)8	F: AAGGTAGCAAGCAAAAGCCA R: CCAACCGGAACCTATGTTGT	3	0.80
38	NNFB_1930	(GGT)7	F: GCACTGAAGAGAGCAACGGT R: TAAAGTTGGCCTCCAACCAC	4	0.84
39	NNFB_2026	(TC)9	F: CCTATCATGCCAATGGGTCT R: AACTGCCCCTCTCTCTCTCC	4	0.87
40	NNFB_2084	(AG)8	F: AGCTTCCAAGTCCACGAAAA R: AAGTCGCCAAAGCGATAGAA	3	0.82
41	NNFB_2135	(GTG)9	F: ATGAGAGGGGAATTTTTGGG R: TAAGTGTCTTCGGCTTGCCT	3	0.81
42	NNFB_2332	(GAA)6	F: CATGGGAATGAAACAAACCA R: GGGACTAGGAGGGCGTTTAG	5	0.87
43	NNFB_2386	(CCT)5	F: ACTCAACTGAACCGTCGTCC R: TTAATGGTTACAGGGCCGAG	3	0.77
44	NNFB_2416	(TC)11	F: CGGCGATTAAGGCTCTGTAG R: GGAAGAAGAGCAGGCTGAGA	4	0.85
45	NNFB_2420	(TC)11	F: CGCTCAGTTCAACACAACCA R: TTGGCTTTCATGACTGTGA	5	0.87
46	NNFB_2504	(ATC)5	F: ATTCACCCAATGCCACCTAA R: TCGATCACATTGATCAAGCC	2	0.67
47	NNFB_2521	(AG)11	F: GAAGGAAGGGGTTTTCCTGA R: GTTAGCGACCCCCGTTTTTT	4	0.83
48	NNFB_2646	(GA)7	F: CTTTGCTGCTACTCCGAACC R: TCCTTCATGCATCTGGTGAG	6	0.89
49	NNFB_2698	(GA)8	F: TGGTTTCCCAACAATTGGAT R: GGCTTTCTTCACCATCTTGC	7	0.90
50	NNFB_2779	(GAT)7	F: TTACGAGGCCAAGGTTCATC R: AACTCCTTGCAATCCATTCG	3	0.77
51	NNFB_2820	(AT)7	F: GGCATACATAACATAGCGTGC R: GGGTGCTTTCATTGGTGTTT	4	0.82
52	NNFB_3042	(CTT)7	F: TCTTAGCACCTCTCAACACCAA R: GGGTCTCAGCGTCAATGTTT	2	0.73
	总计 Total			177	41.12
	平均 Mean			3.4	0.79

2.2 聚类分析

根据 52 对 EST-SSR 引物的扩增结果，用 NTSYS-pc2.11 软件进行聚类分析，得出 50 个供试荷花品种的聚类树图（图 2）。由图 2 可知供试的荷花种质资源的遗传相似系数范围为 0.24~0.86，遗传相似系数小，遗传距离大，其亲缘关系就越远。由此表明本研究所选的供试荷花品种间差异明显，具有较为丰富的遗传变异。

在遗传相似系数为 0.37 时，可以将 50 个供试荷花品种分为四大类群：I，II，III 和 IV。亚洲莲品种均聚类在 I、II 类群中，III 类群为亚美杂交莲品种（除‘友谊牡丹莲’、‘黄牡丹’外），

IV 类群为美洲莲。在亚洲莲品种聚集的第 I 大类群中包含‘粉团’、‘冬红花’、‘傲霜’、‘雪里红’、‘湘韵’和‘粉青莲’6 个亚洲莲栽培品种，其中，重瓣型的‘粉团’与其他 5 个单瓣型的亚洲莲栽培品种相比，表现出较远的亲缘关系。第 II 大类群包括 24 个亚洲莲品种和 2 个亚美杂交莲品种（‘友谊牡丹莲’、‘黄牡丹’）。在遗传相似系数为 0. 42 时，又可以进一步分为 IIa、IIb 两个亚群。IIa 亚群包括 17 个野生型、藕莲、千瓣型、热带型的较原始的品种，其中，来自中国部分地区较原始的亚洲莲大部分聚在一支上，而来自泰国境内的野生莲型（Thai-2#、Thai-8#、Thai-10#）聚在另一支上，这可能与地理分化不同有关；此外，红色、大株型的‘中山红台’和

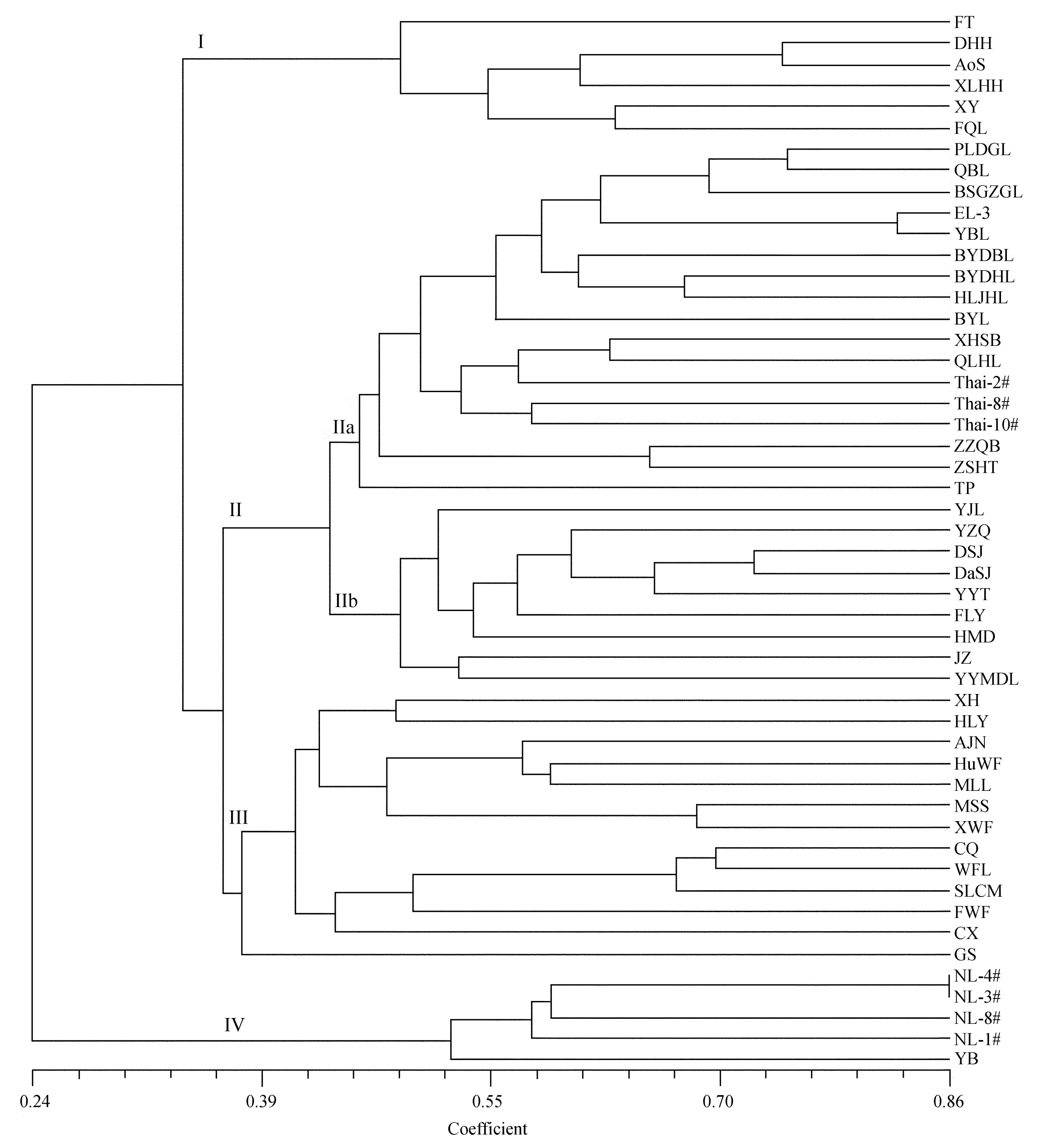


图 2　50 个荷花品种遗传相似系数的非加权组平均法（UPGMA）聚类分析树状图

Fig. 2　A dendrogram of 50 *Nelumbo* accessions using UPGMA method based on genetic similarity

‘至尊千瓣’聚在一起，说明两者亲缘关系较近；IIb 亚群包含有 7 个亚洲莲栽培品种和 2 个亚美杂交莲品种，这 7 个亚洲莲栽培品种大部分为大株、单瓣型品种，如‘易建莲’、‘单洒锦’、‘一丈青’、‘艳阳天’等。第 III 大类群包含有 12 个亚美杂交莲和 1 个美洲莲（‘艾江南’），这表明供试的亚美杂交莲品种除‘友谊牡丹莲’、‘黄牡丹’外均聚在一支上。第 IV 大类群包含黄莲 1#、黄莲 3#、黄莲 4#、黄莲 8#和‘黄鸟’5 个野生型美洲莲居群，其中，‘黄鸟’与其他的 4 个野生型美洲莲居群相比，表现出相对较远的亲缘关系。

由聚类图还可以看出，在遗传相似系数为 0.37 处，包含绝大部分亚洲莲品种的第 II 大类群与包含亚美杂交莲的第 III 大类群聚在一大支上，然后再与第 I 大类群聚在一起，最后才与包含有美洲莲的第 IV 大类群聚在一起，表明亚美杂交莲品种与亚洲莲品种亲缘关系相对较近。

3 讨论

EST-SSR 作为一种与基因表达相关的 SSR 分子标记，不仅具备传统基因组 SSR 标记的共显性、多态性高、重复性好等特点，而且因开发经济、通用性高及性状连锁等优势已在很多植物研究中得到开发和应用。然而，基于 EST-SSR 标记进行荷花种质资源的遗传多样性分析较少且标记数目有限（Kubo 等，2009b；Pan 等，2010；Yang 等，2013）。通常因转录组序列的保守性，EST-SSR 标记的多态性低于基因组 SSR 标记（Eujayl 等，2002；Liang 等，2009），但是本实验筛选的 EST-SSR 标记具有较高的多态性。以前基于基因组 SSR 标记的荷花种质资源遗传多样性方面的研究报道中，平均每对引物的等位基因数为 3.3 ~5.8；平均每对引物的 PIC 值为 0.3~0.5（Kubo 等，2009b；Pan 等，2010，2011；Hu 等，2012；Liu 等，2012；Yang 等，2012a）；基于 EST-SSR 标记的平均每对引物的等位基因数和 PIC 值分别为 2.7、0.3。然而，在本实验中，平均每对 EST-SSR 引物的等位基因数与 PIC 值分别为 3.4、0.79，这表明本实验的 EST-SSR 引物具有更高的多态性，原因一方面可能是供试荷花材料的资源代表性高、基因型丰富；另一方面可能是测序序列的高覆盖率（Eujayl 等，2002；Dutta 等，2011）。

本研究可将供试的荷花品种分为亚洲莲（I、II）、亚美杂交莲（III）和美洲莲（IV）；并且聚于第 I，II 大类群的亚洲莲品种明显与第 IV 类群的美洲莲区分开，这很大程度上与种间长期的地理隔离有关，所得结果与前人的研究相一致（Chen 等，2008；Li 等，2010；Pan 等，2010；Fu 等，2011；Hu 等，2012；Yang 等，2012b）。另外，同属于亚洲莲，分别来自中国和泰国的荷花品种（Thai-2#、Thai-8#、Thai-10#）各自聚在不同的亚支上，表明它们之间也因地理隔离导致遗传变异与分化。聚类于 IIa 亚群的野生型较原始的亚洲莲与第 I 大群类及 IIb 亚群内的栽培亚洲莲品种区别开来，表明由于人工选择、现代农业的发展与进步及生存环境变化的影响，导致它们之间各种性状及遗传背景出现了明显差异。虽然，根据资源的地理分布差异、野生型、栽培品种等传统分类标准，本实验利用 EST-SSR 标记将供试材料明显区分开，但一些品种，特别是栽培型的亚洲莲品种，基于性状分类如株型、花型、花色等，同一类型品种往往聚类于不同的群或亚群内，表明不同品种即使单一性状相同也不一定能聚类到一起。原因一方面可能是供试的荷花品种数量不够大或可用标记数有限，不足以形成一个与形态学特征相一致的清晰的区分模式；另一方面也可能是供试的栽培亚洲莲品种因种内或品种间频繁发生杂交从而产生了较高的遗传多样性（Liu 等，2012），而聚类结果又同时受到多种形态学性状的影响。此外，也可能因荷花品种繁多，部分品种遗传背景复杂或不清，前人根据形态特征可能将其错误分类。

由聚类图可知，原属亚美杂交莲的‘友谊牡丹莲’和‘黄牡丹’却聚在了亚洲莲品种内，这与传统分类记载（王其超和张行言，2005）有出入，可能因为‘友谊牡丹莲’是采用性状倾向于亚洲莲的亚美杂交莲品种‘伯里夫人’（‘Mrs. Perry D. Slocum’）通过自交或同其他品种自然杂交培育而来的（培育者仅记载该品种来源于‘伯里夫人’的种子）；‘黄牡丹’的母本又是‘友谊牡丹莲’。杂交品种经多次杂交或自交后，杂交后代的遗传组成发生了显著变化，表观性状通常由来自亲本的遗传物质比例决定，而这些比例在荷花长期的人工或自然选育过程中表现是不均衡

的（黄国振，1987；Chen 等，2008；刘艺平等，2013），有关这方面的问题有待于进一步探讨研究。原被归类为美洲莲栽培品种的‘艾江南’（张行言和陈龙清，2011）没有聚在Ⅳ（美洲莲群）内，而与亚美杂交莲聚在一起。经观察‘艾江南’不同开花时期花被，我们发现其花色虽为黄色，但瓣尖带红色，而红色只能来源于亚洲莲，这表明‘艾江南’应该是亚美杂交莲后代，之前可能被错误分类。

本研究发现采自同一地方湖南汉寿县城郊的‘玉臂藕’与‘鄂莲 3 号’聚在同一支上，并且遗传相似系数较大为 0.8，两品种间的遗传差异较小，原因可能是：供试采集的‘玉臂藕’与‘湖南泡子’形态学性状相近，可能就是‘湖南泡子’或其近似种源；‘鄂莲 3 号’是由‘湖南泡子’作为母本（仅记载来自湖南，具体产地不详），‘竹节藕’为父本，经过人工杂交选育的品种（周国林等，2000）。以前的研究推测‘至尊千瓣’可能来自与之花色、花型、株型等均相近的‘中山红台’(Tian 和 Tilt，2011；黄秀等，2014)，从本实验聚类结果来看，两者在遗传相似系数大约为 0.60 时聚在一起，表明两者遗传差异小，亲缘关系较近，从分子方面支持验证了这一推测。这些结果也说明本研究开发的 EST-SSR 引物对疑难荷花资源的亲缘关系推断和辅助鉴定起到了很好的效果。

本研究利用 EST-SSR 引物将供试的荷花品种资源清晰地分为亚洲莲、美洲莲、亚美杂交莲三大类群，再次证明了 EST-SSR 标记用于荷花品种遗传多样性分析研究的有效性和重要性。由于荷花种质资源繁多，栽培历史悠久，品种分类混乱，单方面依靠形态学或分子标记研究荷花的遗传多样性及亲缘关系是不够科学的，也很难保证结果准确，只有两者相互结合，相互佐证才能更好地解决莲属的部分种质资源混乱、遗传背景不清和亲缘关系等问题，为更好地保护和利用莲属资源提供科学的决策和实践指导。

致谢　感谢南京艺莲苑丁跃生先生、中科院北京植物园张会金高工、北京莲花池公园李鹏飞工程师、三水荷花世界梁常娥女士、美国奥本大学 Ken Tilt 教授等协助采集部分实验材料。

〔参　考　文　献〕

董玉琛，郑殿升，2005. 国家重点保护农业野生植物要略［M］. 北京：中国气象出版社

王其超，张行言，2005. 中国荷花品种图志［M］. 北京：中国林业出版社

张行言，陈龙清，2011. 中国荷花新品种图志［M］. 北京：中国林业出版社

周国林，柯卫东，傅新发等，2000. 莲藕杂种优势的利用［J］. 长江蔬菜，(3)：31—33

Botstein D, White RL, Skolnick M *et al.*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms［J］. *American Journal of Human Genetics*, **32** (3): 314—331

Chen Y, Zhou RC, Lin XD *et al.*, 2008. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars［J］. *Aquatic Botany*, **89** (3): 311—316

Dutta S, Kumawat G, Singh BP *et al.*, 2011. Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in pigeonpea［*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh］［J］. *BMC Plant Biology*, **11**: 17

Eujayl I, Sorrells ME, Baum M *et al.*, 2002. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat［J］. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 399—407

Fu J, Xiang QY, Zeng XB *et al.*, 2011. Assessment of the genetic diversity and population structure of lotus cultivars grown in China by amplified fragment length polymorphism［J］. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **136** (5): 339—349

Guo HB, Li SM, Peng J *et al.*, 2007. Genetic diversity of *Nelumbo* accessions revealed by RAPD［J］. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54** (4): 741—748

Han YC, Teng ZC, Chang FH *et al.*, 2007. Analyses of genetic relationships in *Nelumbo nucifera* using nuclear ribosomal ITS sequence data, ISSR and RAPD markers［J］. *Aquatic Botany*, **87**: 141—146

Han YC, Teng ZC, Robert W *et al.*, 2009. Mating system and genetic diversity in natural populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) detected by ISSR markers［J］. *Plant Systematics and Evolution*, **277** (1-2): 13—20

Hu JH, Pan L, Liu HG *et al.*, 2012. Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using AFLP and SSR markers［J］. *Molecular Biology Reports*, **39** (4): 3637—3647

Huang GZ (黄国振), 1987. Breeding a new cultivar of yellow lotus *Nelumbo* × *nucifera* cv. Friendship Peony［J］. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **14** (2): 129—132

Huang X (黄秀), Tian DK (田代科), Zhang WW (张微微) *et al.*, 2014. Comparison of floral organ morphological development between single and double flowers in *Nelumbo nucifera*［J］. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **36**

(3): 303—309

Huang XQ (黄秀强), Chen JY (陈俊愉), Huang GZ (黄国振), 1992. Preliminary studies on biosystematic relationship between the two *Nelumbo* species [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **19** (2): 164—170

John HW, 2014. Flora of North America [OL]. http://www.efloras.org/florataxon.aspx? flora_id=1&taxon_id=10608.3

Kubo N, Hirai M, Kaneko A *et al*., 2009a. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. *Aquatic Botany*, **90** (2): 191—194

Kubo N, Hirai M, Kaneko A *et al*., 2009b. Classification and diversity of sacred and American *Nelumbo* species: the genetic relationships of flowering lotus cultivars in Japan using SSR markers [J]. *Plant Genetic Resources*, **7** (03): 260—270

Li Z, Liu XQ, Robert W *et al*., 2010. Genetic diversity and classification of *Nelumbo* germplasm of different origins by RAPD and ISSR analysis [J]. *Scientia Horticulturae*, **125** (4): 724—732

Liang XQ, Chen XP, Hong YB *et al*., 2009. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species [J]. *BMC Plant Biology*, **9** (1): 35

Liu YL, Yang M, Xiang QY *et al*., 2012. Characterization of microsatellite markers and their application for the assessment of genetic diversity among lotus accessions [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **137** (3): 180—188

Liu YG (刘月光), Teng YY (滕永勇), Pan C (潘辰) *et al*., 2006. Cluster analysis of *Nelumbo* based on SRAP markers [J]. *Amino Acids & Biotic Resources* (氨基酸和生物资源), **28** (1): 29—32

Liu YP (刘艺平), Li C (李创), Li N (李娜) *et al*., 2013. ISSR markers based on genetic diversity analysis of *Nelumbo nucifera* Gaertn [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition) (西北农林科技大学学报: 自然科学版), **41** (4): 139—146

Na AN, Guo HB, Ke WD, 2009. Genetic variation in rhizome lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ssp. *nucifera*) germplasms from China assessed by RAPD markers [J]. *Agricultural Sciences in China*, **8** (1): 31—39

Ouyang DM (欧阳冬梅), Liu H (刘凰), Xu JX (徐金星) *et al*., 2012. Genetic diversity analysis of *Nelumbo* accessions based on SRAP markers [J]. *Journal of Changjiang Vegetables* (长江蔬菜), (16): 35—38

Pan L, Xia QJ, Quan ZW *et al*., 2010. Development of novel EST-SSRs from sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) and their utilization for the genetic diversity analysis of *N. nucifera* [J]. *Journal Heredity*, **101** (1): 71—82

Pan L, Quan ZW, Hu JH *et al*., 2011. Genetic diversity and differentiation of lotus (*Nelumbo nucifera*) accessions assessed by simple sequence repeats [J]. *Annals of Applied Biology*, **159** (3): 428—441

Peng YL (彭欲率), Han YC (韩延闯), Wang L (汪岚) *et al*., 2004. Genetic diversity in lotus (*Nelumbo*) accessions revealed by AFLP technique [J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), **2** (6): 823—827

Tian DK, Tilt K, 2011. 'Zhizun Qianban': A recognition of an obscure lotus (*Nelumbo*) cultivar with an interesting legend [J]. *Hortscience*, **46** (7): 1044—1045

Tian HL, Chen XQ, Wang JX *et al*., 2008. Development and characterization of microsatellite loci for lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. *Conservation Genetics*, **9** (5): 1385—1388

Wang L (汪岚), Han YC (韩延闯), Peng YL (彭欲率) *et al*., 2004. Application of ISSR technique to genetic research of lotus root [J]. *Amino Acids & Biotic Resources* (氨基酸和生物资源), **26** (3): 20—22

Wu JD (吴景栋), Liu SC (刘生财), Yang SC (杨盛春) *et al*., 2011. Analysis on genetic diversity of 30 lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) germplasm resources by RAPD marker [J]. *Journal of Changjiang Vegetables* (长江蔬菜), (16): 42—45

Xue JH, Zhuo LH, Zhou SL, 2006. Genetic diversity and geographic pattern of wild lotus (*Nelumbo nucifera*) in Heilongjiang Province [J]. *Chinese Science Bulletin*, **51** (4): 421—432

Yang M, Han YN, Xu LM *et al*., 2012a. Comparative analysis of genetic diversity of lotus (*Nelumbo*) using SSR and SRAP markers [J]. *Scientia Horticulturae*, **142**: 185—195

Yang M, Han YN, Robert VB *et al*., 2012b. Genetic linkage maps for Asian and American lotus constructed using novel SSR markers derived from the genome of sequenced cultivar [J]. *BMC Genomics*, **13**: 653

Yang M, Liu F, Han YN *et al*., 2013. Genetic diversity and structure in populations of *Nelumbo* from America, Thailand and China: Implications for conservation and breeding [J]. *Aquatic Botany*, **107**: 1—7

Yang C (杨春), Liu AZ (刘爱忠), 2011. Development of EST-SSR markers from *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and their application in genetic diversity analysis among germplasms [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **33** (5): 529—534

Yao LH (姚利华), Teng YW (滕元文), 2008. A brief introduction on EST- SSR marker and its application in the research of fruit trees [J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), **25** (2): 219—224